

10/551867

Express Mail Label No.

Dated: _____

JC20 Rec'd PCT/PTO 30 SEP 2005

Docket No.: 09857/0203438-US0 (PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Hideyuki Suzuki et al.

Application No.: Not Yet Known

Confirmation No.: Not Yet Known

Filed: Concurrently Herewith

Art Unit: Not Yet Known

For: QUANTITATIVE REAGENT, METHOD AND
EQUIPMENT OF SUBSTANCE UTILIZING
FLUORESCENCE LIFETIME

Examiner: Not Yet Assigned

AFFIRMATION OF PRIORITY CLAIM

Mail Stop PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:


Applicants hereby claim priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2003-101609	April 4, 2003

A certified copy of the aforesaid Japanese Patent Application was received by the International Bureau on June 24, 2004 during the pendency of International Application No. PCT/JP2004/004630. A copy of Form PCT/IB/304 is enclosed.

Dated: September 30, 2005

Respectfully submitted,

By  *Chris T. Mizumoto*
(53,970)

Chris T. Mizumoto

Registration No.: 42,899

DARBY & DARBY P.C.

New York, New York 10150-5257

(212) 527-7700/(212) 753-6237 (Fax)

Attorneys/Agents For Applicants

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

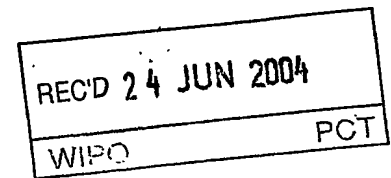
23.04.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 0 1 6 0 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 1 0 1 6 0 9]



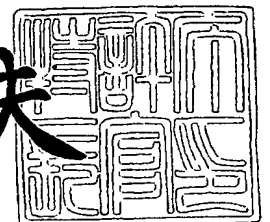
出 願 人 独立行政法人産業技術総合研究所
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 6 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 420-03004

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 鈴木 英之

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 竹村 太郎

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 宮本 延明

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

 【代表者】 吉川 弘之

 【電話番号】 029-861-3280

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光寿命を利用した物質の定量用試薬、方法及び装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検試料中の蛍光分子を検出する方法であって、以下のステップ:

(a) 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定するステップ、
を含むことを特徴とする前記方法。

【請求項 2】 被検試料中の測定対象物質を検出する方法であって、以下のステップ:

(a) 測定対象物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定するステップ、
を含むことを特徴とする前記方法。

【請求項 3】 被検試料中の測定対象物質のタイプを判別する方法であって、以下のステップ:

(a) 測定対象物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定するステップ、

(c) 前記測定された濃度を用いて前記測定対象物質の混合比を算出するステップ、及び

(d) 前記算出された混合比を指標として前記測定対象物質のタイプを判別するステップ、
を含むことを特徴とする前記方法。

【請求項 4】 蛍光寿命が 3 倍以上異なるものである請求項 1～3 のいずれ

か 1 項に記載の方法。

【請求項 5】 蛍光分子の少なくとも 1 種が、既知の濃度を有するものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】 測定対象物質の少なくとも 1 種が、既知の濃度を有するものである請求項 2 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】 測定対象物質がプローブ又はターゲットである請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】 プローブ又はターゲットが核酸である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 被検試料中の蛍光分子の解析方法であって、以下のステップ
:

(a) 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I:

【数 1】

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 A_i は係数、 t は時刻、 τ_i は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって当該蛍光分子の濃度又は混合比を検出するステップ、
を含むことを特徴とする解析方法。

【請求項 10】 測定対象物質の解析方法であって、以下のステップ:

(a) 測定対象物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I:

【数 2】

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 A_i は係数、 t は時刻、 τ_i は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって、当該蛍光分子の濃度又は混合比を検出するステップ、
を含むことを特徴とする解析方法。

【請求項 11】 蛍光強度の計算が、係数 A_i と蛍光寿命 τ_i との積を計算するものである請求項9又は10記載の方法。

【請求項 12】 遺伝子の判別方法であって、以下のステップ：

(a) 被検試料中の遺伝子を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式I：

【数 3】

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 A_i は係数、 t は時刻、 τ_i は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって、当該蛍光分子の蛍光強度を検出するステップ、及び

(c) 前記蛍光強度を指標として遺伝子のタイプを判別するステップ、
を含むことを特徴とする前記方法。

【請求項 13】 蛍光強度の計算が、係数 A_i と蛍光寿命 τ_i との積を計算するものである請求項12記載の方法。

【請求項 14】 少なくとも1種の蛍光分子の蛍光寿命が既知のものである請求項 1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子を含む、測定対象物質の検出用試薬又はキット。

【請求項 16】 被検試料中の蛍光分子を検出する装置であって、以下の手段：

(a) 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定する手段、
を含むことを特徴とする前記装置。

【請求項 17】 被検試料中の測定対象物質の定量装置であって、以下の手段:

(a) 測定対象物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定する手段、
を含むことを特徴とする前記装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中に存在する特定の蛍光分子の定量用試薬、定量方法、定量装置及びその解析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

被検試料中に存在する蛍光を標識した物質の濃度や混合比の測定は、近年主に蛍光分子の蛍光強度を計測することによって行われてきている。すなわち、濃度既知の蛍光分子（以下「参照蛍光分子」という）を被検試料中に入れ、検出の対象となる蛍光分子と参照蛍光分子との蛍光強度を比較することにより、濃度や混合比が未知の蛍光分子を定量することができる。こうした蛍光強度を利用する方法を適用すると、蛍光分子をプローブやターゲットとなる分子に標識し、その強度を比較することにより、ターゲットとなる遺伝子の発現量や一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism、SNP）のタイプを判別することが可能であるため、DNAマイクロアレイ、タックマン法、インベーター法として工業的に応用され、現在広く使われている。例えば、特表平8-510562号公報（特許文献1）には、2種類の蛍光分子を用い、その蛍光強度を比較することによって、PCRによって増幅された核酸の量をモニターする検出方法が開示されている。

【0003】

一方、蛍光分子に固有の蛍光寿命は、蛍光分子の周囲の環境や化学反応の度合いにあまり影響を受けないと考えられていたことから、これまで利用されることが少なかったが、近年可視光領域において高出力のレーザーやレーザーダイオードが開発され、また電子回路の処理速度が高速化し測定精度が向上したことから、バイオ分野にも積極的に使われるようになってきた。例えば、特開平6-66802号公報（特許文献2）には、光ルミネセンスエネルギーの移転がみかけの蛍光寿命に現れることを利用して、免疫反応の反応生成物の存在量を定量する発明が紹介されている。また、特表2002-542453号公報（特許文献3）には「生物学的系についての蛍光分析法」が示されており、供与体と受容体との間に起こる蛍光共鳴エネルギー転移によって蛍光の調節寿命および相寿命が変化することにより、受容体の内部成長度をモニターすることができる測定方法が記載されている。

【0004】

【特許文献1】

特表平8-510562号公報

【0005】

【特許文献2】

特開平6-66802号公報

【0006】

【特許文献3】

特表2002-542453号公報

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

現在普及している被検試料、特に核酸の定量あるいは同定は、PCR法、LAMP法、ICAN法などによって増幅された試料を、蛍光分子で標識し、その蛍光強度を検出することによって実施されている。しかしながら、被検試料の増幅や同定には、長い作業時間と高コストの試薬を必要とすることから、簡便で、低コストの検出方法が求められている。

【0008】

本発明は、蛍光分子の検出方法、検出用試薬、定量装置及び解析方法を提供することを目的とする。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、蛍光分子の蛍光寿命に着目し、蛍光強度の減衰を時間依存的に測定することにより、簡便かつ低コストで検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0 0 1 0】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 被検試料中の蛍光分子を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定するステップ、
を含むことを特徴とする前記方法。

(2) 被検試料中の測定対象物質を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 測定対象物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定するステップ、
を含むことを特徴とする前記方法。

(3) 被検試料中の測定対象物質のタイプを判別する方法であって、以下のステップ：

(a) 測定対象物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定するステップ、

(c) 前記測定された濃度を用いて前記測定対象物質の混合比を算出するステップ、及び

(d) 前記算出された混合比を指標として前記測定対象物質のタイプを判別するステップ、

を含むことを特徴とする前記方法。

(4) 上記方法において、例えば蛍光寿命が3倍以上異なるものを使用することができる。また、蛍光分子の少なくとも1種が既知の濃度を有するものを使用することができる。測定対象物質としては、プローブ又はターゲット（例えば核酸）などを例示できる。

(5) 被検試料中の蛍光分子の解析方法であって、以下のステップ：

(a) 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式I：

【数4】

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 A_i は係数、 t は時刻、 τ_i は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって当該蛍光分子の濃度又は混合比を検出するステップ、

を含むことを特徴とする解析方法。

(6) 被検試料中の測定対象物質の解析方法であって、以下のステップ：

(a) 被検物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式I：

【数5】

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 A_i は係数、 t は時刻、 τ_i は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって、当該蛍光分子の濃度

又は混合比を検出するステップ、
を含むことを特徴とする解析方法。

(7) 遺伝子の判別方法であって、以下のステップ:

(a) 被検試料中の遺伝子を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式I:

【数6】

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 A_i は係数、 t は時刻、 τ_i は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって、当該蛍光分子の蛍光強度を検出するステップ、及び

(c) 前記蛍光強度を指標として遺伝子のタイプを判別するステップ、
を含むことを特徴とする前記方法。

上記解析方法において、蛍光強度は、係数 A_i と蛍光寿命 τ_i との積を計算することにより算出される。また、蛍光強度は、係数 A_i と蛍光寿命 τ_i との積を計算することにより算出される。

上記解析方法及び判別方法において、少なくとも1種の蛍光分子の蛍光寿命が既知のものを使用することが好ましい。

(8) 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子を含む、測定対象物質の検出用試薬又はキット。

(9) 被検試料中の蛍光分子を検出する装置であって、以下の手段:

(a) 異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定する手段、

を含むことを特徴とする前記装置。

(10) 被検試料中の測定対象物質の定量装置であって、以下の手段:

(a) 被検物質を標識した異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定する手段、
を含むことを特徴とする前記装置。

【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、蛍光分子から発せられる蛍光強度が時間の経過により減衰する点に着目し、当該蛍光強度の減衰を時間依存的に測定することを考えた。そして、異なる蛍光寿命を持つ蛍光分子を含有する被検試料の蛍光強度の蛍光減衰曲線（試料から発せられる蛍光強度の時間依存性）を単一光子計数法（「蛍光測定」木下一彦・御橋廣真編、学会出版センター）により測定した。

【0013】

本発明において、蛍光寿命とは、パルス励起光による蛍光強度 I_0 が $1/e$ （ e は自然対数の底を表す。）となるまでの時間を意味し、蛍光分子が固有に有する値である。例えば5-カルボキシナフトフルオレセインは0.65ナノ秒（nsec）、フルオレセインは4.04nsecである。

【0014】

単一光子計数法は、光の最低単位である光子を1個1個検出する方法であるため、あらゆる光検出法の中で最も感度が高く、一般的に用いられる蛍光強度や吸光度に比較し、極微量の試料の蛍光寿命を、濃度に依存することなく安定的に測定するのに適している。例えば、図1に示すように、セル、チューブ、マイクロプレート等に入れた被検試料1（被検試料中に測定対象物質が含まれている）にパルス光源2からパルス光3を照射し、試料1から発せられる蛍光4を光電子増倍管（PMT: photomultiplier tube）5で検出する。光源2の波長及び光電子増倍管5で検出する光の波長は、フィルターまたは分光器により選択する。パルス光源2からの信号をスタート信号とし、光電子増倍管5からの信号をストップ信号

としてアンプ6、定フラクションデスクリミネータ (CFD: constant fraction discriminator) 7を経由して時間-電圧変換器 (TAC: Time to Amplitude Converter) 8に入力すると、光電子増倍管5で検出されるタイミングによって、TAC 8の出力信号に差が出るため、これをマルチチャンネルアナライザ (MCA: Multi Channel Analyzer) 9に取り込むことにより、蛍光寿命を測定することが可能である。出力信号は、パーソナルコンピュータ (PC) 10のハードディスク等に保存される。

【0015】

本発明においては、異なる蛍光寿命を持つ蛍光分子 F_1 (蛍光寿命 τ_1) と F_2 (蛍光寿命 τ_2) を用いて蛍光分子 F_2 の濃度を測定する場合について説明する。

【0016】

測定対象物質を蛍光色素等で標識し、その蛍光強度を測定すると、波長と蛍光強度との関係を曲線として得ることができる。まず、蛍光分子 F_1 と F_2 の吸収バンド (吸収スペクトル) を測定する。測定結果は、図2に示す曲線として得られる (F_{1ab} , F_{2ab})。ここで、蛍光分子 F_1 と F_2 の吸収バンド (吸収スペクトル) は、利用する光源の波長と重なっていることが望ましい。但し、光源の波長より長波長領域に吸収バンドが存在しても、励起光の一部が蛍光分子に吸収されれば F_1 及び F_2 が蛍光を発することが可能である (図2)。

【0017】

実際の測定でレーザー光源を利用する場合には、蛍光分子 F_1 と F_2 の入った試薬を励起波長 λ_{ex} で励起し、励起側波長フィルター11 (図1) として、減光フィルター (NDフィルター) を用いて励起光の強さを調整する。一方、蛍光側波長フィルター12 (図1) として、励起光が検出されないようロングパスフィルターを使用する。ただし、ロングパスフィルターの代わりに、特定の波長領域を選択するためのバンドパスフィルターや、ロングパスフィルターとショートパスフィルターを併用して使用してももちろん構わない (図1)。

【0018】

蛍光寿命 τ_1 と蛍光寿命 τ_2 が異なる場合に、被検試料の蛍光減衰曲線を測定する場合について説明する。

【0019】

蛍光分子F₁で標識したときの蛍光強度の曲線が図3左側に示すように、また、蛍光分子F₂で標識したときの蛍光強度の曲線が図3右側に示すように得られるものとする。そして、蛍光強度は時刻t₁から一定時間(t₂, t₃)の経過とともに(すなわち時間依存的に)減衰し(図3)、蛍光寿命τに至る。本発明においては、時間軸を新たに設定し、蛍光減衰曲線を得ることを試みた。すなわち、図3に示す座標に新たに時間軸を設けると、それぞれの時間において各蛍光強度の曲線を連続的に表示することができる(図4)。蛍光強度のカウントとして便宜的に各曲線の頂点を結ぶと、図4に示す曲線S₁が得られる(図4は、簡略のためF₁についての曲線S₁のみを表示する)。

【0020】

そして、F₁及びF₂についてそれぞれ曲線S₁、S₂を求め、これを対数プロットすると、図5のパネル(a)に示す結果が得られる。この対数プロットを蛍光減衰曲線とする。図5のパネル(a)は、複数の測定試料を独立して測定したときの蛍光減衰曲線を同一のグラフに表したものである。複数の測定対象を同一の測定系において測定した場合は、蛍光減衰曲線は、図5のパネル(b)に示す曲線となる。このようにして得られる蛍光減衰曲線を指標として、蛍光分子がどの程度存在するのか、その濃度を測定することができる。蛍光分子が測定対象物質に結合して測定対象物質を標識した場合は、その測定対象物質の濃度が測定される。

【0021】

一般には、i種類の異なる蛍光寿命を有する蛍光分子を用いて蛍光減衰曲線を求める場合の蛍光寿命関数f(t)は、次式Iで表される。

【0022】

【数7】

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

$$= A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + A_3 \exp(-t/\tau_3) + \cdots + A_k \exp(-t/\tau_k)$$

(式中、A_iは係数、tは時刻、τ_iは蛍光寿命を表す。)

被検試料に含まれる蛍光分子の蛍光寿命とその強度は、測定された蛍光減衰曲線をDeconvolutionすることによって求められる。その結果得られる係数Aと蛍光寿命 τ の値から、各蛍光分子の蛍光強度の割合が $(A_i \times \tau_i)$ (ここで $i = 1, 2, 3, \dots$) に比例するため、その混合比を、 $(A_1 \times \tau_1) : (A_2 \times \tau_2) : (A_3 \times \tau_3) : \dots$ という方法で見積ることが可能である。そして被検試料に含まれる蛍光分子のうちの一つを参照蛍光分子として、濃度が常に一定になるように被検試料に加えることにすれば、蛍光強度を比較することによって、濃度が未知の他の蛍光分子の濃度を求めることができる。

【0023】

上記2種類の異なる蛍光寿命 τ_1 と蛍光寿命 τ_2 を有する蛍光分子を用いた場合において、被検試料の蛍光減衰曲線を測定すると、後述の実施例に示すように図6のようなデータが観察される。そして、装置の応答関数 $g(t)$ と蛍光分子の持つ本質的な蛍光寿命関数 $f(t)$ との畳み込み積分である蛍光強度の減衰をDeconvolutionすることにより求める。その結果得られる係数Aと蛍光寿命 τ の値から、その混合比は、 $(A_1 \times \tau_1) : (A_2 \times \tau_2)$ により算出される。そして被検試料に含まれる蛍光分子のうちの一つを参照蛍光分子として、濃度が常に一定になるように被検試料に加えることにすれば、蛍光強度を比較することによって、濃度が未知の他の蛍光分子の濃度を求めることができる。

【0024】

さらに、本発明は、上述のように蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び蛍光強度を比較することで濃度を測定する手段を含む測定装置を提供する。

【0025】

本発明によれば、これまで蛍光スペクトルの重なりが大きいために同じ溶液中で同時に使用できなかった標識用の複数の蛍光分子でも、それぞれの蛍光寿命が3倍以上異なれば、その蛍光スペクトルに関係なく利用できることになり、検出を多重化(マルチプレックス)し、ハイスループットで測定する際にこれまでにないメリットがある。すなわち、これまで蛍光強度を比較することによって解析していた多くのアプリケーションに対し、本発明で示されているような蛍光分子

の組合せを適用し、生産性を向上することが可能である。このことは具体的には、蛍光側波長フィルターとしてバンドパスフィルターを使用すると、蛍光強度の時間依存性だけでなく、波長依存性も利用することができ、検出しようとする対象物質に対して同時に標識できるプローブの数を飛躍的に増大させることが可能になり、アッセイの高効率化とコスト削減を実現することができることを意味する。また、 τ_1 と τ_2 との蛍光寿命の差は、3倍以上、より好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上であることが、定量・定性分析を安定的に行う上では望ましい。

【0026】

このような蛍光寿命の測定に用いることが可能な蛍光分子として、例えば以下の色素等が挙げられる：Cascade Yellow, Dapoxyl carboxylic acid, Pacific Blue, 7-Hydroxycoumarin-3-carboxylic acid, PyMP0, 5-carboxynaphthofluorescein, Dabcyl LysoSensor, Lucifer Yellow, Alexa Flour, NBD-X, DCCH, HEX, JOE, ROX, Texas Red, TET, TAMRA (米国Molecular Probes 社製), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7 (アマシャムバイオサイエンス社製), FITC。

【0027】

これらの蛍光分子は、本発明において測定対象物質を測定するためのキット又は試薬として使用される。キットには、上記蛍光分子のほか、緩衝液、使用説明書、部品などを含めてもよい。

【0028】

以上の例では、異なる蛍光寿命を持つ蛍光分子が入った溶液中に存在する特定の蛍光分子の濃度を測定する方法を示したが、本発明の測定方法は、標識されたプローブまたはターゲット（例えば核酸、タンパク質、ペプチド、リガンド、レセプター、ドナー、ホルモン、糖鎖）の濃度同定や蛍光を発する微量物質の同定・検出に適用できる。また、種類の異なる測定物質（例えば遺伝子）の判別をすることも可能である。

【0029】

そうした例として、DNAマイクロアレイ、タックマン法、インベーター法等で使用されている蛍光分子を、本発明で示されているような蛍光寿命の異なる複数の

蛍光分子で置き換えることによって、マルチプレックス化し、ハイスループットで遺伝子等の測定対象物質を解析することが可能になる。図7には本発明をSNPのタイピングに応用した場合に得られる蛍光寿命の蛍光減衰曲線を表す。

【0030】

上記例では、光源としてレーザーダイオード (LD) やレーザーを使用する場合について説明したが、それ以外にフラッシュランプや発光ダイオード (LED) を使ってももちろん構わない。

【0031】

なお、本発明においては、パルス周波数、パルス強度、パルス径は、測定対象によって適宜選択することができる。例えば、パルス周波数は1kHz～1GHzであり、パルス強度は数 μ W～数百Wである。また、パルス径は数十 μ m～数十mmである。

【0032】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0033】

実施例1：異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の定量測定

本実施例では、0.65 ns (τ_1) の蛍光寿命を持つ 5-carboxynaphtofluorescein (以下「CNF」という) をF₁とし、4.04 ns (τ_2) の蛍光寿命を持つフルオレセイン をF₂とし、前者を参照蛍光分子として両蛍光分子を含む被検試料の蛍光減衰曲線を図1の測定原理を使って測定し、蛍光強度の比を観察した。CNFの吸収スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長は、それぞれ591 nm と 649nm である。また、フルオレセインの吸収スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長は、それぞれ494nm と519nm である。

【0034】

操作として蛍光分子CNFおよびフルオレセインが表1の割合で含まれるバッファー (組成：pH=7.6, 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 30 mM KCl, 5 mM MgCl₂) 溶液を調製し、その蛍光減衰曲線を測定した (図6)。被検試料を波長408nm のLD光

源で励起し、430nmのロングパスフィルターを使って、測定したところ、表1のような結果が得られた。ここでは、CNFとフルオレセインそれぞれの単体が入った溶液からそれぞれに固有の蛍光寿命を求め、予め求めた蛍光寿命を利用して、指数関数の係数 A_i (ここで $i = 1, 2$) を計算した。

【0035】

この結果から明らかなように、CNFとフルオレセインの蛍光寿命の比が6倍以上あるため、CNFとフルオレセインに由来する蛍光寿命の成分を分離することは容易であり、CNFに対するフルオレセインの濃度を変えると、それに応じて、蛍光寿命の蛍光減衰曲線から得られる蛍光強度の比が直線的に変化することが認められる(図8)。この結果を検量線として利用すると、濃度未知のフルオレセインが入った被検試料の蛍光減衰曲線を測定し、参照蛍光分子に対する濃度の割合を求めることによって溶液中のフルオレセインの濃度を特定することが可能である。図8から明らかなように、定量したいフルオレセインの濃度が約3桁変化しても直線性が維持できることから、フルオレセインの濃度が0.0015~0.5 μ Mの範囲から外れる場合でも、参照蛍光分子のCNFの量を変えることによって、フルオレセインの濃度を特定することが可能である。また、濃度既知の2種類以上の参照蛍光分子を溶液中に混合することによって、フルオレセインの濃度検出範囲(ダイナミックレンジ)をさらに広げることも可能である。

【0036】

【表1】

表1 FITC 及び CNF 混合系の蛍光寿命とその割合

ID	測定条件				フィッティング結果							該当図
	CNF (μ M)	FITC (μ M)	FITC/CNF	log (FITC/CNF)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	B_1	B_2	χ^2	$\tau_2 B_2 / \tau_1 B_1$	$\log (\tau_2 B_2 / \tau_1 B_1)$	
1	4	0			0.65				1.25			
2	4	0.0015	0.000375	-3.426	0.65	4.04	0.941	0.059	1.13	0.390	0.053	
3	4	0.005	0.00125	-2.903	0.65	4.04	0.756	0.244	1.24	2.006	0.093	図6(a)
4	4	0.015	0.00375	-2.426	0.65	4.04	0.686	0.314	1.19	2.845	0.076	
5	4	0.05	0.0125	-1.903	0.65	4.04	0.527	0.473	1.22	5.579	0.086	
6	4	0.15	0.0375	-1.426	0.65	4.04	0.145	0.855	1.36	36.649	0.134	図6(b)
7	4	0.5	0.125	-0.903	0.65	4.04	0.124	0.876	1.31	43.909	0.117	
8	0	0.05				4.04			1.17			

※フィッティング結果は τ_1, τ_2 を固定して two exponential でフィッティングしたものである。
 ※フィッティング関数: $A [B_1 \exp(-t/\tau_1) + B_2 \exp(-t/\tau_2)]$ ($B_1 + B_2 = 1$)

実施例2：異なる蛍光寿命を有する蛍光分子を利用したインバーダー法によるSNP（一塩基配列）のタイピング方法

実験操作として、初めに容量1.5mLのエッペンドルフチューブにヒトのゲノムDNA(40 ng/ μ L)を10 μ L分注した。チューブを大気中に放置して溶媒を蒸発させた

後、CNFとフルオレセインが標識されたFRETプローブの入ったInvader 法の試薬約20 μ Lを分注した。チューブを密閉した後、95℃で5分間 DNA を変性し、63℃の恒温槽中で4時間反応させ、反応終了後、被検試料を波長408nm のLD光源で励起し、430nmのロングパスフィルターを使って、被検試料から発せられる蛍光の蛍光減衰曲線を図1の蛍光寿命測定の原理を使って測定し、SNPの頻度を解析（タイピング）した。その結果、蛍光減衰曲線から得られる（CNFの蛍光強度）/（フルオレセインの蛍光強度）から換算した（CNFの濃度）/（フルオレセインの濃度）の値が、ホモ接合体の試料に対しては、6～120、または0.01～0.15となり、ヘテロ接合体の試料に対しては、0.2～4になった。この結果から明らかなように、異なる蛍光寿命を有する蛍光分子をタイピングする対象となるSNPのFRETプローブに対して標識することにより、ホモ接合体とヘテロ接合体の違いを判別することが可能である。

【0037】

実施例3：異なる蛍光寿命を有する蛍光分子を利用したタックマン法によるSNPのタイピング方法

実験操作として、初めに容量1.5mLのエッペンドルフチューブにゲノムDNA(40 ng/ μ L)を10 μ L分注した。チューブを大気中に放置して溶媒を蒸発させた後、CNFとフルオレセインが標識されたTaqMan 法の試薬約20 μ Lを分注した。試薬を分注した後、サーマルサイクラーにて、95℃で10分間 DNA を変性し、(95℃で1分、60℃で3分)というインキュベーションのサイクルを40回行った。反応終了被検試料を波長408nm のLD光源で励起し、430nmのロングパスフィルターを使って、被検試料から発せられる蛍光の蛍光減衰曲線を図1の蛍光寿命測定の原理を使って測定し、SNPの頻度を解析（タイピング）した。その結果、蛍光減衰曲線から得られる（CNFの蛍光強度）/（フルオレセインの蛍光強度）から換算した（CNFの濃度）/（フルオレセインの濃度）の値が、ホモ接合体の試料に対しては、5～95、または0.015～0.2となり、ヘテロ接合体の試料に対しては、0.23～4.2になった。この結果から明らかなように、異なる蛍光寿命を有する蛍光分子をタイピングする対象となるSNPのプローブに対して標識することにより、ホモ接合体とヘテロ接合体の違いを判別することが可能である。

【0038】

【発明の効果】

本発明により、蛍光分子の定量方法、定量用試薬、定量装置及びその解析方法が提供される。本発明は、異なる蛍光寿命を持つ蛍光分子をプローブまたはターゲットとなる物質に標識し、低濃度の被検試料に対して高感度に検出することができるため、測定対象物質の検出又は定量用試薬として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明で利用する単一光子計数法の測定原理及び測定装置を表す。

【図2】

本発明における2種類の蛍光分子の関係を説明するためのスペクトルを示す。 F_{1ab} と F_{1em} はそれぞれ蛍光分子 F_1 の規格化された吸収スペクトルと蛍光スペクトル、 F_{2ab} と F_{2em} はそれぞれ蛍光分子 F_2 の規格化された吸収スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

【図3】

波長と蛍光強度との関係を示す模式図である。

【図4】

蛍光強度を時間軸に沿ってプロットした模式図である。

【図5】

蛍光強度と時間との関係の蛍光減衰曲線を示す図である。

【図6】

本発明における蛍光分子に由来する蛍光の蛍光減衰曲線の典型例を示す。(a)は表1のID3、(b)はID6の場合にそれぞれ該当する。

【図7】

本発明をSNPのタイピングに応用した場合に得られる蛍光減衰曲線を表す。

【図8】

蛍光寿命の蛍光減衰曲線から得られる蛍光強度の比が直線的に変化することを示す図である。

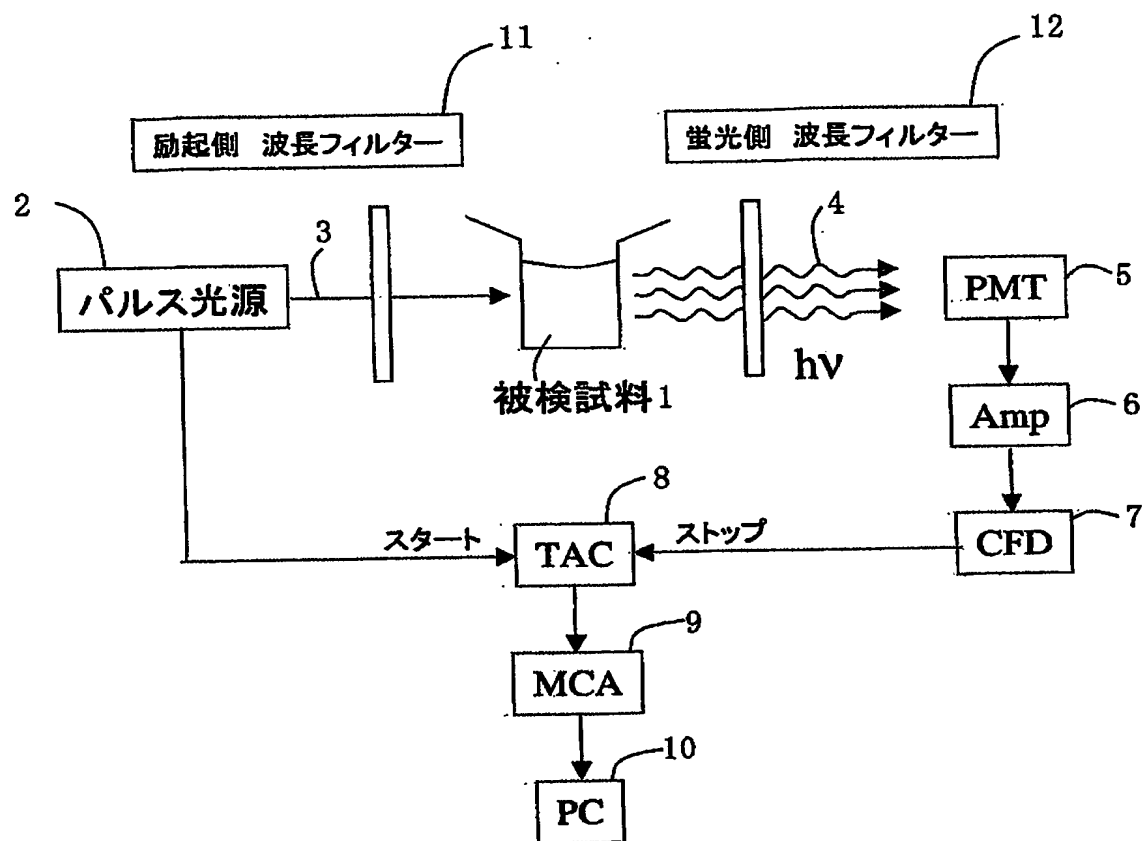
【符号の説明】

1：被検試料、 2：パルス光源、 3：パルス光、 4：蛍光、 5：光電子
増倍管、 6：アンプ、 7：定フラクシヨンデスクリミネータ、 8：時間-
電圧変換器、 9：マルチチャンネルアナライザ、 10：パーソナルコンピュー
タ、 11：励起側波長フィルター、 12：蛍光側波長フィルター

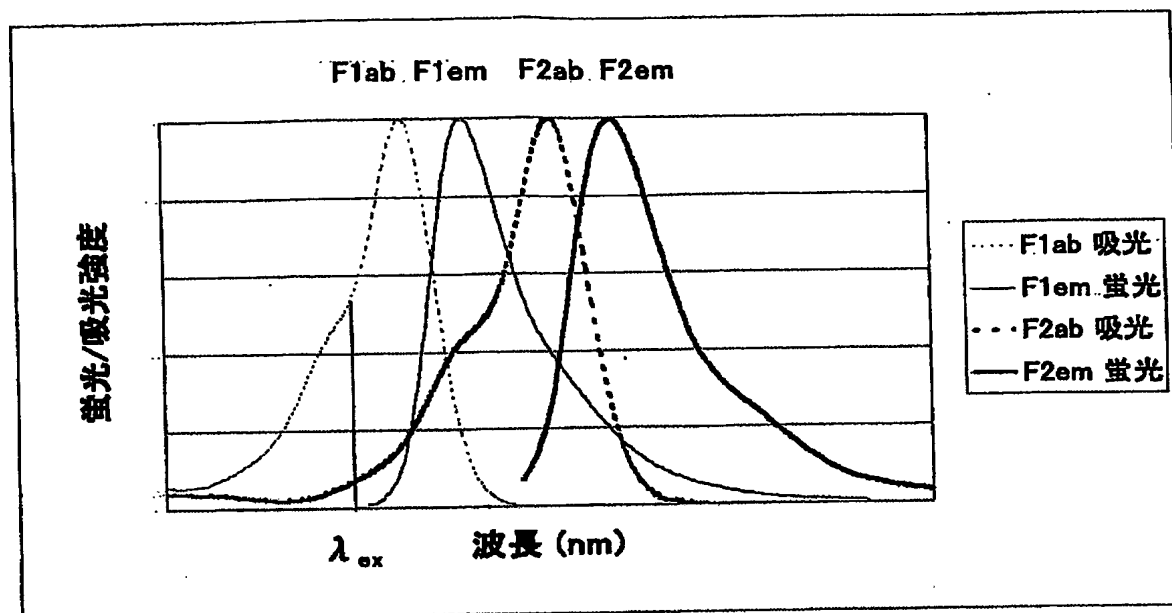
【書類名】

図面

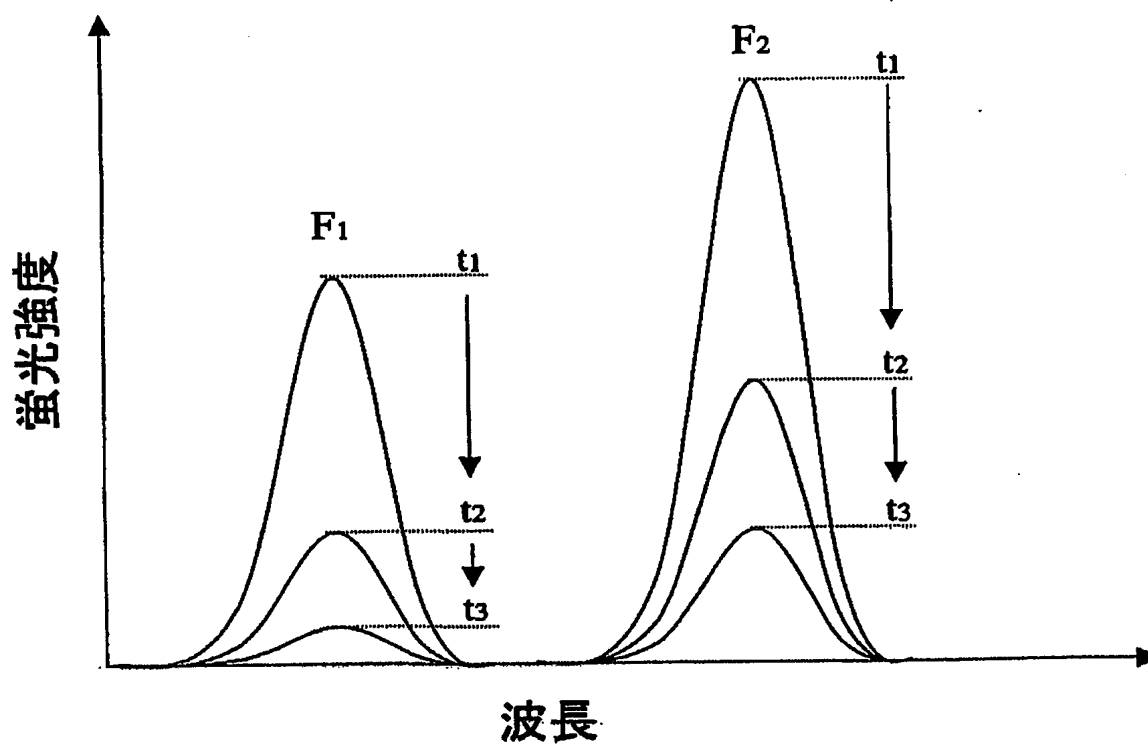
【図 1】



【図2】

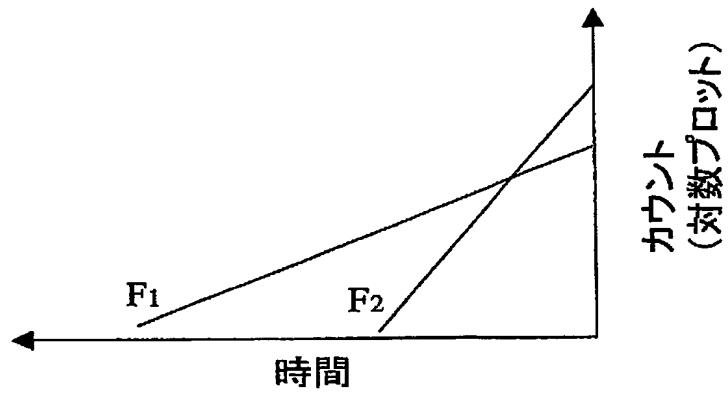


【図3】

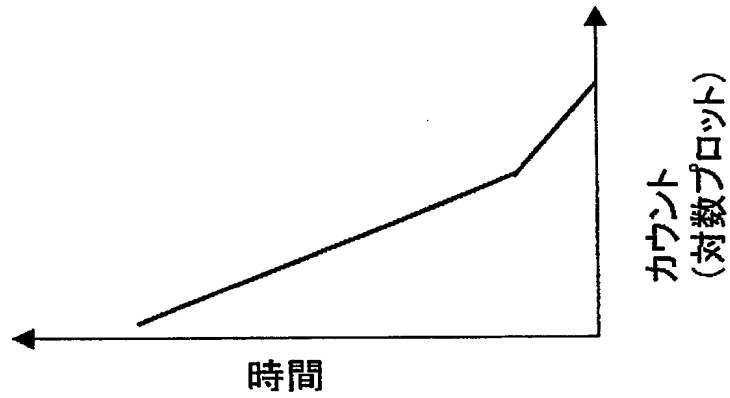


【図 5】

(a)

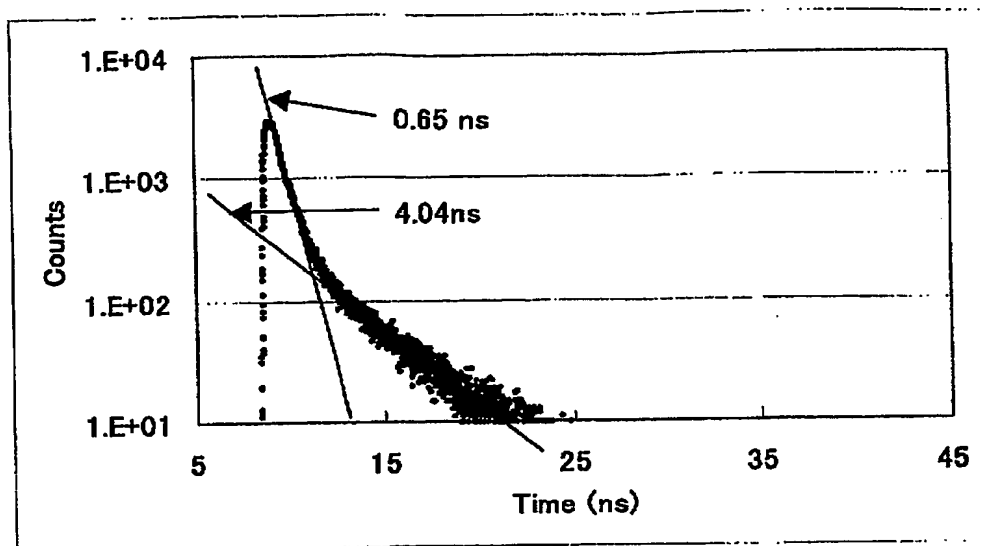


(b)

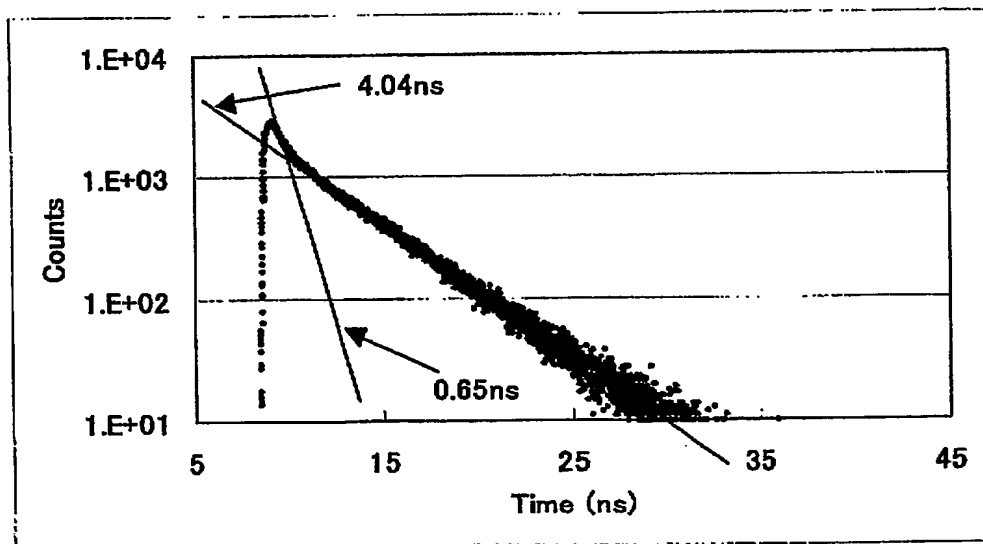


【図6】

(a)

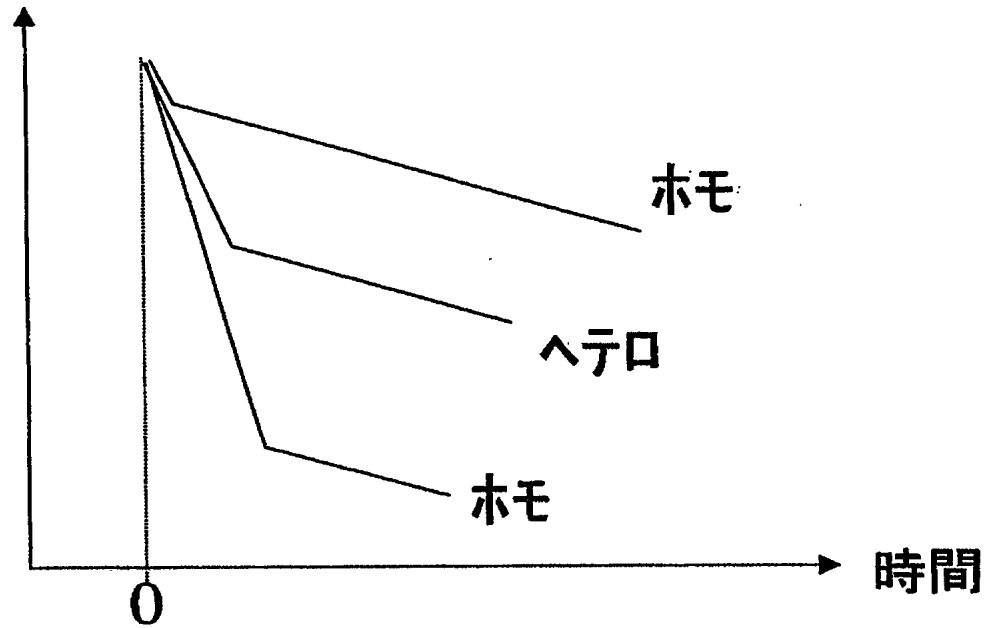


(b)

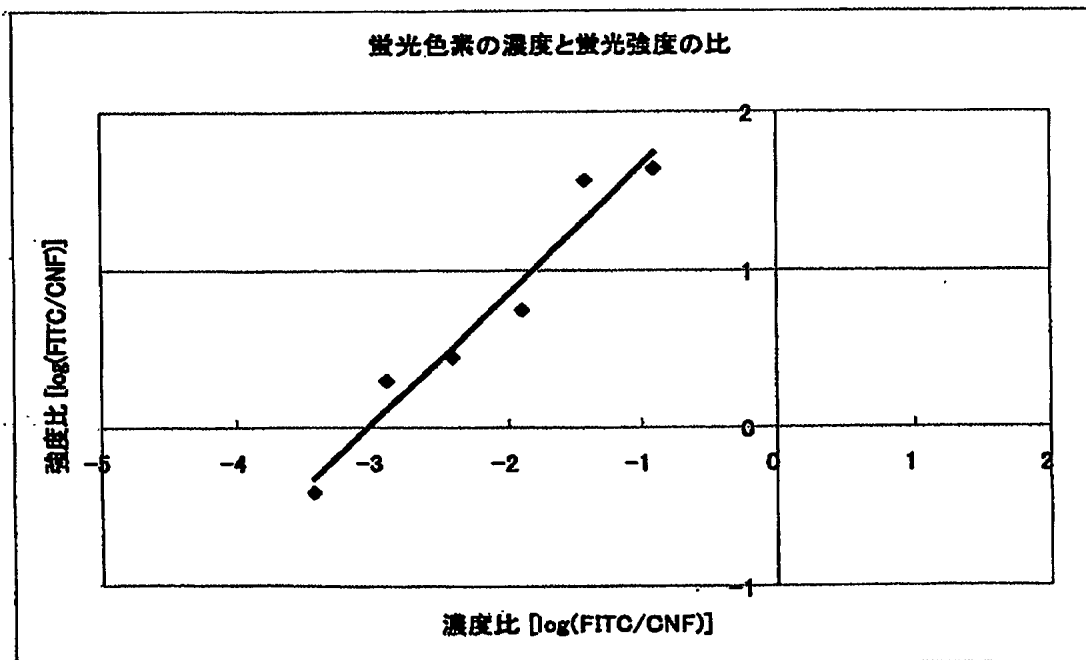


【図 7】

カウント(対数プロット)



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 蛍光分子の定量方法、定量用試薬、定量装置及びその解析方法の提供

。

【解決手段】 被検試料中の蛍光分子を検出する方法であって、以下のステップ：
：(a)異なる蛍光寿命を有する蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、及び(b)前記測定された蛍光強度を比較することによって当該蛍光分子の濃度を測定するステップを含むことを特徴とする前記方法。

【選択図】 図6

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-101609
受付番号	50300565996
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年 4月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 4月 4日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 0 1 6 0 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.